

Eine Mikromethode zur Bestimmung von Metaboliten im Muskelgewebe

Von R. ZWIEBEL¹⁾ und R. KIRSTEN

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 29. März 1968)

Es wird eine Mikromethode zur Analyse von Glykolyse substraten und energiereichen Phosphaten im Muskelgewebe beschrieben. Diese umfaßt einen Gefrierstop, die Anfertigung 10–20 μm dünner Schnitte in einem Kryostaten und deren Aufschluß mit Hilfe von Ultraschall. Die Metabolitanalyse erfolgt fluorometrisch. Die Testzusammensetzung wird für folgende Substrate²⁾ beschrieben: G-6-P, G-1-P, F-6-P, FDP, DAP, G, M, L, PY, ATP, ADP, AMP, CP und Glucose. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte für ATP und CP liegen nur um 11 bzw. 19% höher als die mit bisherigen Methoden erzielten. Die Werte der Glykolyse metabolite liegen jedoch weit unter den Quotienten anderer Organe und Flüssigkeiten. Die niedrigen Gehalte glykolytischer Substrate und der L/P-Quotient weisen darauf hin, daß die beschriebene Mikromethode dazu beiträgt, der Erfassung des Status *in vivo* näherzukommen. Die beschriebene Methode bietet folgende Vorteile:

1. Der Gewebebedarf für die Metabolitanalyse von 14 Substraten beträgt etwa 30–40 mg. Bei den bisherigen Verfahren brauchte man ungefähr 1 g.
2. Mit Hilfe der Schneidetechnik werden die Enzyme schon vor dem eigentlichen Aufschluß mit Ultraschall inaktiviert, da die Säure die dünnen Schnitte schnell durchdringen kann und so die weiterlaufenden Stoffwechselprozesse gebremst werden.
3. Das untersuchte Gewebe kann histologisch untersucht werden, die Beimengung unerwünschter Gewebelemente festgestellt und mit Hilfe besonderer Technik entfernt werden.

A micromethod for the determination of metabolites in muscle

A micromethod is described for the analysis of glycolytic intermediates and high energy phosphates in muscle tissue. The tissue is frozen, sliced to 10–20 μm thickness in a cryostat, and the slices submitted to ultrasonic disruption. The metabolites are determined fluorimetrically. The composition of the test mixture is given for the following substrates: G-6-P, G-1-P, F-6-P, FDP, DAP, G, M, L, PY, ATP, ADP, AMP, CP and glucose. The values for ATP and CP obtained by this method are only 11 and 19% higher, respectively, than those hitherto obtained by other methods. The values for the glycolytic intermediates are, however, very much lower than those measured previously. The L/P quotient, calculated from the concentrations of L and PY, is about 12; it is thus close to that for other organs and fluids. The low value for glycolytic intermediates and the L/P quotient show that the concentrations determined by the above micromethod approach those obtaining *in vivo*.

The above method has the following advantages:

1. 30–40 mg of tissue are required for the determination of 14 substances. Other methods demand about 1 g.
2. The enzymes are inactivated during the slicing process, before the ultrasonic disruption, because the acid rapidly penetrates the thin slices. Further metabolism is thus stopped.
3. The tissue under test can be investigated histologically, and if any undesired tissue elements are present, they can be removed by special techniques.

Um den Zellstoffwechsel im Muskelgewebe und funktionelle Veränderungen desselben zu erfassen, ist die Bestimmung der Metabolite notwendig. Bei der Aufarbeitung von Gewebeproben wird gewöhnlich der Metabolitgehalt in nicht genau bestimmbarer Ausmaß verändert. Dies geschieht einmal dadurch, daß die Stoffwechselprozesse bis zum Gefrierstop weiterlaufen und außerdem säureempfindliche Metabolite bei der unvermeidlichen Säureextraktion zerstört werden.

Im folgenden wird eine Methode beschrieben³⁾, die die bisherigen Methoden zum Gewebeaufschluß verbessert, so daß Veränderungen des *in-vivo*-Status vermindert, wenn nicht ganz vermieden werden. Diese Methode

bietet außerdem noch zwei wichtige Vorteile: Erstens, daß Mikromengen von 30–40 mg Gewebe für die Analyse von mehreren Metaboliten (im angeführten Beispiel 14) ausreichen und zweitens, daß die Zusammensetzung des Gewebes mikroskopisch kontrolliert und dabei unerwünschte Gewebelemente wie Fett, Bindegewebe und Gefäße entfernt werden können.

Beschreibung der Methode

Frierstop

Das von HOHORST angegebene Verfahren (1) wurde in den Grundzügen übernommen. Männliche und weibliche Wistar-ratten mit einem Gewicht von 150 bis 220 g wurden mittels intraperitonealer Injektion von Inactin (5-Äthyl-5-(1-Methylpropyl)-2-thiobarbitursäure) narkotisiert. Die Dosierung betrug 160 mg/kg Körpergewicht. Zur Vermeidung einer Auskühlung wurden die Tiere auf einem Operationstisch mit einer 25 W starken Lampe bestrahlt. 15 bis 20 Min. nach Injektion wurde die Bauchmuskulatur freigelegt, diese in der Medianlinie unter Eröffnung der Bauchhöhle durchtrennt. Die nun freiliegende Muskulatur wurde mit 2 Pinzetten vorsichtig angehoben und zwischen 2 mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten zangenartigen Blöcken gepreßt und das erfaßte Gewebe schnell in flüssigen Stickstoff versenkt.

¹⁾ Diese Arbeit enthält wesentliche Teile der Dissertation von R. ZWIEBEL.

²⁾ Abkürzungen: s. S. 409.

³⁾ *Addendum*. Wie wir erst nach Abschluß der Arbeit erfahren, haben Th. Bücher und Mitarbeiter bereits 1964 die Grundzüge der hier beschriebenen Aufschlußmethode veröffentlicht (Bücher, Th., K. Krejci, W. Rüßmann, H. Schnitger und W. Wesemann, in *Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry*, Hrsg. B. Chance et al. Academic Press, New York-London, 1964).

Aufschluß des Gewebes³⁾

Ein kleines Stück des gewonnenen Gewebes wurde auf eine Gefrierkammer gelegt. Gleichzeitig wurde diese Kammer mit flüssiger Kohlensäure unterkühlt, so daß das Gewebe anfror. Anschließend wurde die Gefrierkammer in einen Kryostaten gebracht und dort in ein Mikrotom eingeschraubt. Die Temperatur des Kryostaten betrug etwa -26 bis -28° . Es wurden Schnitte von $20\ \mu\text{m}$ Dicke angefertigt. Diese wurden im Kühlraum in einem Polyäthylengeäß rasch gewogen. Ein Auftauen wurde dabei vermieden. Anschließend wurden die Schnitte mit $0,6\text{N HClO}_4$ überschichtet, und unter Kühlung in einem Eis-Salz-Bad von -15° 2×15 Sek. mit einer Pause von 30 Sek. mit Ultraschall behandelt. Wie die Abbildung 1 zeigt, steigt bei dieser Behandlung die Temperatur um etwa 2 bis 3° , um in der Pause die tiefe Ausgangstemperatur beinahe wieder zu erreichen.

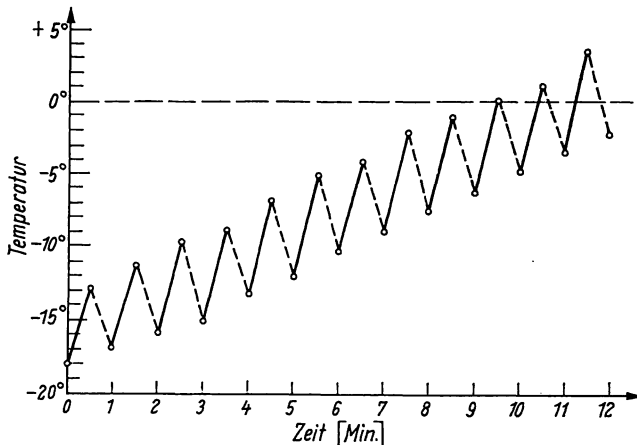


Abb. 1

Temperaturverlauf während Ultraschallbehandlung. Beschallt werden $0,6\text{ ml } 0,6\text{N HClO}_4$ in einem Polyäthylengeäß bei 190 mA . Die Schalldauer beträgt 30 Sek., ebenso die Pause zwischen 2 Beschallungen. Die Registrierung der Temperatur erfolgt alle 30 Sek. mit Hilfe eines Kontaktthermometers der Fa. Gossen, Berlin

o-o Beschallung o---o Pause

Das Gewebegemisch wurde in einer Eppendorf-Mikro-Zentrifuge 2 Min. lang zentrifugiert, der Überstand in $2\text{N K}_2\text{CO}_3$ — $0,5\text{N TRA}$ -Puffer neutralisiert, der Rückstand nochmals beschallt und zum ersten Überstand gegeben. Nachdem die Kohlensäure abgeraucht war, wurde 2 Min. lang zentrifugiert, der Überstand möglichst vollständig abgenommen und gewogen. Der Verdünnungsfaktor errechnete sich aus:

Endvolumen des Extraktes/Frischgewicht des Gewebes.

Der Faktor lag zwischen 20 und 40. Der Überstand wurde nun sofort zur Metabolitanalyse verwendet.

Metabolitanalyse

In dem so gewonnenen Extrakt wurden folgende Metabolite²⁾ bestimmt: Glucose, ATP, ADP, CP, G-6-P, G-1-P, F-6-P, FDP, DAP, L, PY. Außerdem wurden noch Tests zur Bestimmung von M, G und AMP ausgearbeitet. Die Bestimmungsansätze sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Durch die Anwendung fluorometrischer Technik in der enzymatischen Analyse von Metaboliten und Enzymen (2—9) ist eine hohe Empfindlichkeit gewährleistet. Die Bestimmung von Metaboliten geschieht mit Hilfe von NAD- bzw. NADP-spezifischen

³⁾ Zubehör: 1. Kryostat der Fa. Dittes, Heidelberg, mit einem Mikrotom der Fa. Jung, Heidelberg; 2. Eine Vorrichtung der Fa. Jung zum Anfrieren von Gewebe mittels flüssiger Kohlensäure; 3. Mikrowaage der Fa. Sauter; 4. Ultraschallgerät, Branson, Danbury, Conn., USA, Typ Sonifier; 5. Mikrozentrifuge, Eppendorf Gerätebau GmbH, Hamburg; 6. Automatische Pipetten, Typ Marburg; 7. Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzzusatz und entsprechende Filter; 8. Mikroküvetten der Fa. Hellma, Müllheim, Baden, Maximalvolumen $330\ \mu\text{l}$.

Dehydrogenasen. NADH und NADPH zeigen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Absorption und eine der Absorption proportionale Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 450 nm . Die Fluoreszenz ist bei geringen Konzentrationen der Menge an reduzierten Pyridinnucleotiden proportional. Da kein Fluoreszenzkoeffizient besteht, existieren grundsätzlich zwei Möglichkeiten, Konzentrationsbestimmungen von Metaboliten mittels Fluorometrie auszuführen. Entweder kann eine Eichgerade (Abb. 2) aufgestellt werden, oder es kann nach Ablauf der enzymatischen Reaktion eine bekannte Menge des zu bestimmenden Metaboliten hinzugegeben werden („innerer Standard“).

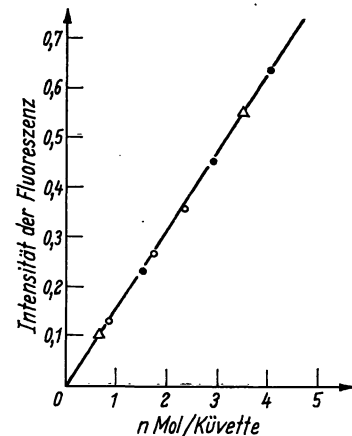


Abb. 2

Eichgerade für die Bestimmung von G-6-P (•), ATP (o) und CP (Δ)

Die Zuverlässigkeit der einzelnen Schritte wurde gesondert überprüft: Bei jedem Extraktionsschritt wurde mehrmals das Trockengewicht bestimmt. Es betrug immer zwischen 23 und 25%. Die Wiedergewinnung hinzugegebener Metabolite mit und ohne Gewebe betrug immer 96—103%. Der Rückstand wurde histologisch untersucht; Querstreifung konnte nicht festgestellt werden. Die Menge an gebildetem NADH bzw. NADPH in der Küvette überschreitet niemals 20 nMol (Grenze der Proportionalität). Die Enzyme wurden so verdünnt, daß sie keine wesentliche Fluoreszenzänderung bei Zugabe zum Reaktionsgemisch hervorriefen. Der

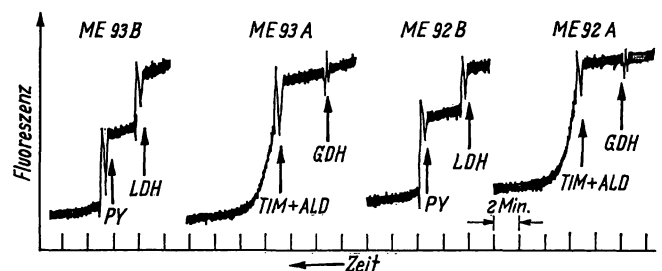


Abb. 3

Beispiel für zwei Bestimmungen von PY, DAP und FDP im Extrakt. Von rechts nach links: Messung von DAP und FDP (ME 92A), Messung von PY mit innerem Standard; entsprechendes Vorgehen mit ME 93A und B

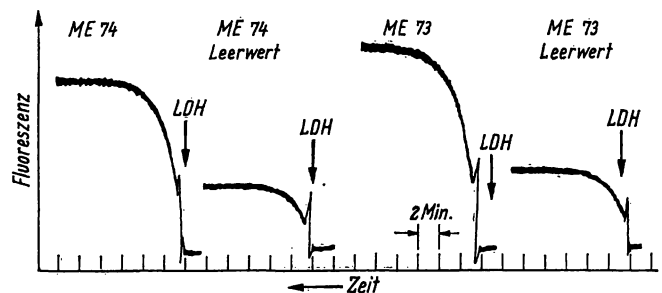


Abb. 4

Beispiel für eine Lactat-Bestimmung. Der Papierstreifen läuft von rechts nach links; der Abstand zweier vertikaler Linien entspricht einer Laufzeit von 2 Min. Man beachte, daß die beiden Leerwerte ME 73 und ME 74 ungleich sind

Tab. 1

Die Tests für die Metabolitanalyse sind tabellarisch wiedergegeben. Die 1. Rubrik enthält das zu bestimmende Substrat. In der zweiten Reihe stehen die Substanzen des Reaktionsgemisches, das neben Puffer und Salzen das entsprechende Coenzym enthält (Comix). In der dritten Spalte ist die Küvettenzusammensetzung für die Metabolitbestimmung mit Extrakt angegeben; in der vierten findet sich die Zeit der enzymatischen Reaktion bei Raumtemperatur, nach der keine Fluoreszenzänderung mehr stattfindet

Substrat ¹⁾	Comix	Reaktionsansatz	Zeit (Min.)
Glucose-6-phosphat	0,01 ml NADP (12 mM) 1,4 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,1 ml Extrakt 0,2 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg)	5
Glucose-1-phosphat	0,01 ml NADP (12 mM) 1,4 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,1 ml Extrakt 0,2 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg) 0,005 ml PGM (10 µg)	15
Fructose-6-phosphat	0,01 ml NADP (12 mM) 1,4 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,1 ml Extrakt 0,2 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg) 0,005 ml PGI (2 µg)	15
Adenosintriphosphat	0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml Glucose (5,5M) 0,01 ml NADP (12 mM) 1,4 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,01 ml Extrakt 0,28 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg) 0,005 ml HK (5 µg)	5
Kreatinphosphat	0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml Glucose (5,5M) 0,01 ml NADP (12 mM) 1,4 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,005 ml Extrakt 0,28 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg) 0,005 ml HK (5 µg) 0,005 ml ADP (0,1M) 0,005 ml CPK (100 µg)	10
Pyruvat	0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml KCl (2M) 0,01 ml ATP (0,1M) 0,02 ml PEP (0,1M) 0,025 ml NADH (3,7 mM) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,15 ml Extrakt 0,15 ml Comix 0,005 ml LDH (12,5 µg)	2
Adenosindiphosphat	0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml KCl (2M) 0,01 ml ATP (0,1M) 0,02 ml PEP (0,1M) 0,025 ml NADH (3,7 mM) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,05 ml Extrakt 0,25 ml Comix 0,005 ml LDH (12,5 µg) 0,005 ml PEP (0,1M) 0,005 ml PK (25 µg)	5
Adenosinmonophosphat	0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml KCl (2M) 0,01 ml ATP (0,1M) 0,02 ml PEP (0,1M) 0,025 ml NADH (3,7 mM) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,1 ml Extrakt 0,2 ml Comix 0,005 ml LDH (12,5 µg) 0,005 ml PEP (0,1M) 0,005 ml PK (25 µg) 0,005 ml MK (2,5 µg)	10
Lactat	0,01 ml NAD (0,06M) 0,5 ml bidest. Wasser 0,5 ml Hydrazin-Glycin-EDTA-Puffer (pH 9,5)	0,05 ml Extrakt 0,25 ml Comix 0,005 ml LDH (12,5 µg)	15
Glycerophosphat	0,01 ml NAD (0,06M) 0,5 ml bidest. Wasser 0,5 ml Hydrazin-Glycin-EDTA-Puffer (pH 9,5)	0,05 ml Extrakt 0,25 ml Comix 0,005 ml GDH (2,5 µg)	15
Malat	0,01 ml NAD (0,06M) 0,5 ml bidest. Wasser 0,5 ml Hydrazin-Glycin-EDTA-Puffer (pH 9,5)	0,05 ml Extrakt 0,25 ml Comix 0,005 ml MDH (25 µg)	15
Glucose	0,01 ml NADP (12 mM) 0,01 ml MgCl ₂ (0,7M) 0,01 ml ATP (0,1M) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,05 ml Extrakt 0,25 ml Comix 0,005 ml ZF (2,5 µg) 0,005 ml HK (5 µg)	5
Dihydroxyacetonphosphat	0,025 ml NADH (3,7 mM) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,15 ml Extrakt 0,15 ml Comix 0,005 ml GDH (2,5 µg)	5
Fructose-1,6-diphosphat	0,025 ml NADH (3,7 mM) 1,0 ml TRA-HCl-Puffer (0,1M; pH 7,6)	0,1 ml Extrakt 0,1 ml Comix 0,005 ml GDH (2,5 µg) 0,005 ml TIM/ALD (je 10 µg)	5

¹⁾ Folgende Abkürzungen werden verwendet: TRA = Triäthanolamin; ZF = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.94); PGM = Phospho-glucumutase (EC 2.7.5.1); PGI = Phospho-glucosomerase (EC 5.3.1.9); HK = Hexokinase (EC 2.7.1.1); CPK = Creatinphosphokinase (EC 2.7.3.2); LDH = Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27); PK = Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40); MK = Myokinase (EC 2.7.4.3); MDH = Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37); GDH = Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8); Ald = Aldolase (EC 4.1.2.7); TIM = Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1). G-6-P = Glucose-6-phosphat, G-1-P = Glucose-1-phosphat, F-6-P = Fructose-6-phosphat, FDP = Fructose-1,6-diphosphat, DAP = Dihydroxyacetonphosphat, G = Glycerophosphat, M = Malat, L = Lactat, Py = Pyruvat, CP = Kreatinphosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat.

Alle Enzyme wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen. Ebenso die meisten Substrate bis auf Glucose und Malat (Serva, Heidelberg), Glycerophosphat und Lactat (Sigma, USA), MgCl₂, KCl, Hydrazin, Glycin und EDTA (Merck, Darmstadt).

Tab. 2

Metabolitgehalte in µMol/Gramm Frischgewicht mit Standardabweichung; Zahl der Versuche in Klammern; Näheres siehe Text

Substrate	Zange 1 (2,25 cm ²)	Zange 2 (8,75 cm ²)	Werte von HONORST (1)
ATP	6,75 ± 0,218 (8)	6,35 ± 0,167 (7)	6,09 ± 0,12 (19)
ADP	0,634 ± 0,157 (5)	0,671 ± 0,115 (8)	0,741 ± 0,024 (19)
CP	25,2 ± 0,767 (7)	23,1 ± 1,29 (7)	21,2 ± 0,800 (11)
G-6-P	0,075 ± 0,006 (17)	0,215 ± 0,011 (13)	0,769 ± 0,101 (24)
F-6-P	—	0,058 ± 0,015 (11)	0,291 ± 0,051 (10)
FDP	0,024 ± 0,010 (10)	—	0,050 ± 0,006 (25)
DAP	<0,010 (10)	0,013 ± 0,004 (8)	0,031 ± 0,003 (28)
L	0,729 ± 0,080 (10)	1,25 ± 0,145 (7)	2,06 ± 0,140 (28)
PY	0,057 ± 0,009 (10)	0,102 ± 0,011 (9)	0,097 ± 0,007 (28)
Glucose	1,09 ± 0,147 (6)	1,5 ± 0,084 (10)	2,53 ± 0,330 (6)
L/P	12,8	12,2	21,3

quantitative Ablauf jeder Reaktion wurde durch die Zugabe einer geringen Menge (1–2 nMol) des zu bestimmenden Substrates geprüft (Abb. 3). Eigenblindwerte waren zu berücksichtigen bei ADP, das wenig ATP enthält und umgekehrt, bei NADH, das AMP enthält, und PEP, das PY enthält. Auch bei der Lactatbestimmung ist ein Blindwert unbekannter Herkunft zu berücksichtigen (Abb. 4). Die erzielten Ergebnisse wurden, wenn möglich, mit photometrischen Testen überprüft. Die Ergebnisse entsprachen sich.

Ergebnisse

In Tabelle 2 sind die ermittelten Gewebsgehalte der untersuchten Metabolite angegeben. Bei den Werten der ersten Spalte wurde eine Frierstopzange von 2,25 cm², bei den Werten der zweiten Spalte eine Zange von 8,75 cm² Kontaktfläche benutzt. Die dritte Spalte enthält die von HOHORST angegebenen Werte (1). Die Werte der energiereichen Phosphate ATP und CP zeigen von der dritten Spalte bis zur ersten Spalte einen stetigen Anstieg. Der Anstieg der Werte ist signifikant. Dagegen zeigen die Ergebnisse der glykolytischen Substrate ein gegensinniges Verhalten. Von der dritten bis zur ersten Spalte ist ein beträchtlicher Abfall der Werte zu erkennen, der alle gemessenen Substrate außer Pyruvat betrifft. Der Pyruvatgehalt wurde nur bei Benutzung der Zange mit der kleinen Fläche vermindert gefunden. Der L/P-Quotient ist in Spalte 1 und 2 gleich, jedoch nur etwa halb so groß wie bei dem methodischen Vorgehen von HOHORST (Spalte 3).

Diskussion

Bei der Besprechung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß sich die Metabolitgehalte der Muskulatur allein schon bei Reizung derselben oder bei schlechtem Aufschlußverfahren (z. B. zu hohe Temperatur oder zu lange Säureeinwirkung) in charakteristischer Weise verändern: Die energiereichen Phosphate ATP und besonders CP sinken ab, während die glykolytischen Substrate und der L/P-Quotient ansteigen. Davon ausgehend soll im folgenden das Abweichen unserer Methode von dem Vorgehen früherer Untersucher in einzelnen Punkten erörtert werden. Unsere Variationen bestanden in der Benutzung eines anderen Narkotikums, in einer modifizierten Aufarbeitung des Gewebes und der Verwendung zweier verschieden großer Zangen.

HOHORST verwandte in seinen Versuchen Äther, während wir Inactin, ein Thiobarbiturat, als Narkotikum gebrauchten. Ein von uns angestellter, in Tabelle 3 wiedergegebener Vergleich unter Benutzung dieser beiden Narkotika zeigte, daß bei sonst gleichem Vorgehen wie HOHORST die Metabolitgehalte von ATP und CP im Muskel bei Inactinnarkose über den Werten bei Äthernarkose liegen, wogegen die glykolytischen Substrate bei Inactin unter den Ätherwerte liegen. Ähnliche Unterschiede mit beiden Narkosearten sahen wir auch bei Benutzung unserer Mikromethode (Spalte 2 und 3 der Tab. 4). Der Inactinnarkose ist also bei Bestimmung des Ruhestatus der Muskelmetabolite der Vorzug zu geben. Der Einfluß der Mikromethode allein auf den Metabolitstatus ist zu ersehen, wenn man

Tab. 3

Metabolitgehalte der Beinhmuskulatur der Ratte nach Anwendung verschiedener Narkotika. Das methodische Vorgehen entspricht dem HOHORSTschen Verfahren (1). Die Größe der Zange beträgt 8,75 cm². In Spalte 1 sind die Ätherwerte aufgetragen: niedrige ATP- und CP-Werte und hohe G-6-P- und L-Werte. Die Inactinwerte sind in Spalte 2 zu sehen: hohe ATP- und CP-Werte und niedrige G-6-P- und L-Werte

Substrate	Äthernarkose n = 9	Inactinnarkose n = 9
CP	19,46	20,58
C	10,36	9,07
ATP	5,92	6,45
ADP	0,68	0,66
AMP	0,089	0,097
G-6-P	0,79	0,54
Glucose	1,5	0,96
L	2,38	1,61
Py	0,098	0,074
L/P	24,3	21,9

Angaben in $\mu\text{Mol}/\text{Gramm}$ Frischgewebe; n = Anzahl der Versuche

Tab. 4

Metabolitgehalte bei Äther- und Inactinnarkose (Spalte 2 und 3) bei Anwendung der im methodischen Teil beschriebenen Mikromethode im Vergleich zu den Metabolitgehalten bei Äthernarkose nach HOHORST (Spalte 1). Angaben in $\mu\text{Mol}/\text{g}$ Frischgewebe, Zangengröße: 8,75 cm². Näheres siehe Diskussion

	Werte von HOHORST (Tabelle 2)	Werte mit Äther (n = 4)	Werte mit Inactin (Tabelle 2)
ATP	6,09	6,2	6,35
CP	21,2	22,2	23,1
G-6-P	0,741	0,45	0,215
L	2,06	1,6	1,25

die mit unserer Mikromethode unter Äthernarkose gewonnenen Werte (Spalte 2 Tab. 4) mit den ebenfalls unter Äthernarkose gewonnenen Ergebnissen von HOHORST (Spalte 1 Tab. 4) vergleicht.

Die Werte von ATP und CP sind höher, die Gehalte von G-6-P- und L niedriger als die Ergebnisse von HOHORST. Für diesen Unterschied ist allein die unterschiedliche Aufschlußmethode verantwortlich, denn das Narkotikum und die Größe der Zange (8,75 cm²) sind gleich. Die höheren ATP- und CP-Gehalte und die niedrigeren G-6-P- und L-Werte dürften durch folgende Vorteile gegenüber dem HOHORSTschen Verfahren bedingt sein:

1. Durch die Anfertigung feiner Gewebeschnitte werden die Enzyme von der Säure schnell inaktiviert und so die weiterlaufenden Stoffwechselvorgänge gebremst.
2. Durch den schnellen und schonenden Gewebsaufschluß mit Hilfe von Ultraschall und die sehr schnelle Neutralisation der Säure wird der Zerfall von empfindlichen Metaboliten verringert. Der hohe Gehalt an empfindlichem CP ist dafür als Anhaltspunkt zu werten.
3. Durch die Schneidetechnik werden die oberflächlichen und am schnellsten durch den Gefrierstop fixierten Gewebspartien analysiert.

Besondere Beachtung verdient das Verhalten des L/P Quotienten. Unser L/P-Quotient von 12,8 bzw. 12,2 stimmt mit den gemessenen Quotienten von Leber, Gehirn, Serum und Schweiß (5, 10, 11) unter Ruhebedingungen gut überein. Daraus ist zu schließen, daß auch im Muskel der L/P-Raum mit dem Extrazellulärraum im Gleichgewicht steht und ein Wert von 10–12 dem *in-vivo*-Status nahe kommt.

Schließlich hat noch die Fläche der Gefrierstopzange einen Einfluß auf die Ergebnisse (Spalte 1 und 2 in Tab. 2). Das Narkotikum und die Aufschlußmethode

sind völlig analog. Zange 1 hat eine Fixierungsfläche von 2,25 cm². Mit dieser viel kleineren Zange ist es möglich, die durch die Präparation irritierten Muskelpartien nahe dem Medianschnitt zu meiden und mehr lateral Gewebe zu entnehmen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen einen weiteren Anstieg der energiereichen Phosphate ATP und CP und einen deutlichen Abfall der glykolytischen Substrate. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist nur die unterschiedliche Zange zu berücksichtigen. Wenn mit dieser kleinen Zange Gewebe nahe dem Medianschnitt entnommen wurde, so entsprachen die erzielten Substratgehalte denen der Zange 2, so daß die Entnahme des Muskelgewebes weiter lateral und entfernt den am

stärksten irritierten Muskelpartien für die niedrigen bzw. hohen Gehalte verantwortlich ist.

Bei der Betrachtung der Glucose-Werte in Tabelle 2 endlich ist zu bedenken, daß Glucose nur in geringen Mengen intrazellulär vorkommt und der Hauptteil des gemessenen Gehaltes auf den extrazellulären Anteil entfällt. So ist der höhere Wert bei Benutzung einer größeren Zange (Spalte 2 der Tab. 2 im Vergleich zu Spalte 1) durch Reizung der Muskulatur und der noch höhere bei der HOHORST-Methode (Spalte 3 der Tab. 2) durch die Äthernarkose erklärbar. Äthernarkose führt zu einer beträchtlichen Hyperglykämie und außerdem zu einer Senkung des Glykogengehaltes. Letzteres ist auch bei Reizung der Muskulatur zu beobachten.

Literatur

1. HOHORST, H. J., Habilitationsschrift 1962, Marburg. — 2. BÜCHER, TH. und W. RÜSSMANN, *Angew. Chem.* 75, 881 (1963). — 3. DUBACH, U. C., *Klin. Wschr.* 41, 157 (1963). — 4. LOWRY, O. H., J. V. PASSONNEAU, F. X. HASSELBERGER und D. W. SCHULZ, *J. biol. Chemistry* 239, 18 (1964). — 5. LOWRY, O. H., J. V. PASSONNEAU und M. K. ROCK, *J. biol. Chemistry* 236, 2756 (1961). — 6. LOWRY, O. H. und J. V. PASSONNEAU, *J. biol. Chemistry* 239, 31 (1964). — 7. LOWRY, O. H., J. V. PASSONNEAU, D. W. SCHULZ

und M. ROCK, *J. biol. Chemistry* 236, 2746 (1961). — 8. SERAY-DARIAN, K., W. F. H. M. MOMMAERTS und A. WALLNER, *J. biol. Chemistry* 235, 2191 (1960). — 9. UDENFRIEND, S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. Academic Press, London-New York (1962). — 10. HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ und TH. BÜCHER, *Biochem. Z.* 332, 18 (1959). — 11. EMRICH, H. M. und R. K. H. ZWIEBEL, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 290, 315 (1966).

Dr. R. Zwiebel
MPI für Biophysik
6000 Frankfurt a. M. 70
Kennedy-Allee 70

Die enzymatische Bestimmung von Glycerin im Blutserum und in Organextrakten

Von H. J. SEITZ und W. TARNOWSKI

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. J. Kühnau)

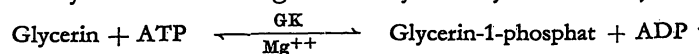
(Eingegangen am 26. April 1968)

Die Leistungsfähigkeit der bisher angegebenen enzymatischen Bestimmungsmethoden für Glycerin im Blutserum und in Organextrakten wird untersucht und kritisch diskutiert. Eine zuverlässige, schnelle und relativ billige Methode wird angegeben, die exakt reproduzierbare Werte liefert. Die starke Abhängigkeit der Serumglycerinwerte von der Art der Narkose wird demonstriert.

The enzymic determination of glycerol in blood serum and in organ extracts

The efficiency of available methods for the enzymic determination of glycerol in blood serum and organ extracts was studied and discussed critically. A reliable, rapid and relatively cheap method is reported, that yields exactly reproducible results. The strong dependence of the serum glycerol value on the nature of narcosis was demonstrated.

Die gebräuchlichen¹⁾ enzymatischen Bestimmungsmethoden für Glycerin basieren auf dessen Phosphorylierung zu Glycerin-1-phosphat durch ATP unter der katalytischen Wirkung des Enzyms Glycerokinase²⁾:

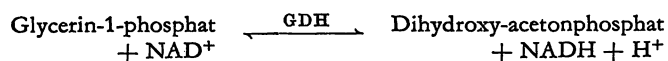


¹⁾ Der von HAGEN und HAGEN (1, 2) angegebene Nachweis mit Glycerindehydrogenase aus *Aerobacter aerogenes* hat sich nicht durchgesetzt. Die Substrateichkurve der Methode ist keine Gerade. Daher müssen bei jeder Bestimmung eine Reihe von Eichstandards mitgeführt werden.

²⁾ Folgende Abkürzungen und Bezeichnungen werden gebraucht: PEP = Phosphoenolpyruvat; TRA = Triäthanolamin; GK = Glycerokinase (EC 2.7.1.30); LDH = Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27); PK = Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40); GDH = Glycerin-1-phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.8); Halothan = 1,1,1-Trifluor-2-brom-2-chloräthan, Nembutal = Pentobarbital.

Diese Reaktion kann sichtbar gemacht werden, indem — nach dem Prinzip des gekoppelten optischen Testes von WARBURG — eines der Reaktionsprodukte nachgewiesen wird:

a) Glycerin-1-phosphat nach dem Vorschlag von WIELAND (3) (vgl. auch (4), (5)):



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt mit $K_e = 5,8 \cdot 10^{-12} \text{ Mol/l}$ (6) weit auf der linken Seite. Daher gelingt der quantitative Nachweis von Glycerin-1-phosphat nur dann, wenn die Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden: Dihydroxyacetonphosphat durch Hydrazin, Protonen durch ein al-